

УДК 595.121

ПРИСТЕНОЧНОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ ПЛЕРОЦЕРКОИДА
LIGULA INTESTINALIS

О. Н. Давыдов и Л. Я. Косенко

Институт гидробиологии АН УССР, Киев

Обнаружение амилазы в растворах, содержащих живых плероцеркоидов лигул, способной расщеплять крахмал до глюкозы, а также значительное количество ее в поверхностном слое кутикулы паразита и литературные данные о наличии микроворсинок на них свидетельствуют о существовании пристеночного пищеварения и высокой приспособленности плероцеркоидов к окружающим условиям обитания.

На разных стадиях развития у паразитов наблюдаются различные способы питания, которые соответствуют месту их обитания и морфологическим особенностям (Марков, 1946). О питании ленточных червей было известно, что оно происходит за счет хозяина окончательно расщепленными им, с помощью его ферментов, пищевыми материалами, которые только абсорбируются покровными тканями паразита. Это представление, хотя и является общепринятым, приводит к серьезным противоречиям. В частности, электронномикроскопические исследования, вскрывшие сложный характер кутикулы у цестод, показали, что покровные ткани их играют более сложную и активную роль в их питании, чем только абсорбция расщепленных хозяином пищевых веществ (Логачев, 1955; Тимофеев, 1964; Rothman, 1960; Threadgold, 1965; Charles a. Orr, 1968).

Наличие структурного сходства между микроворсинками (микротрихиами) на поверхности тела ленточных червей и щеточной каймы кишечника позвоночных животных совершенно изменяют представление о питании цестод (Дубинина, 1966). Далее было установлено, что всасывание питательных продуктов у них происходит через микроворсинки (Lumsden, 1966; Rothman, 1968).

Было показано, что у плероцеркоидов лентецов и некоторых половозрелых цестод, содержащихся в солевой среде с добавлением питательных веществ, удлиняется их срок жизни *in vitro*. Это дало основание (Кротов, 1961, 1969; Дубинина, 1966) предположить, что питание ленточных червей не является единственным путем за счет расщепленных хозяином пищевых веществ, что наряду с этим, по-видимому, у них существует пристеночное (контактное) пищеварение, аналогично позвоночным животным (Уголев, 1960).

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Эксперименты проводились на плероцеркоидах лигул (*Ligula intestinalis*), извлеченных из брюшной полости естественно зараженных карповых рыб (плотва, лещ). Было проведено несколько серий экспериментов.

В первой серии опытов исследовали гидролиз крахмала в присутствии живых плероцеркоидов лигул. Испытуемые лигулы помещались в 20 мл 0.1% крахмала. Наличие глюкозы в результате расщепления крахмала определялось ферментативным (глюкозооксидазным) методом с применением кристаллического гемоглобина крупного рогатого скота — вместо

препарата пероксидазы (по инструкции Института биохимии АН УССР). О присутствии глюкозы судили по возникновению красно-вишневой окраски в исследуемой среде.

Во второй серии опытов определение амилолитической активности проводили в растворах, содержащих живых плероцеркоидов лигул. Выбранных плероцеркоидов промывали водой и выдерживали при определенной температуре в дистиллированной воде в бюксах в течение 12 час. Содержимое бюкс сливали затем в измерительные пробирки и исследовали на наличие и активность амилазы. Во всех опытах количество раствора с находящимися живыми паразитами в каждой пробе составляло 10 мл. Активность амилазы выражалась количеством мг крахмала, расщепленного за минуту 1 мл исследуемого раствора, содержавшего плероцеркоида, в пересчете на 1 г живого веса.

В третьей серии опытов амилолитическая активность определялась в гомогенатах покровного слоя и в тканях тела плероцеркоидов лигул. Покровный слой получали следующим образом. Живая лигула, длиной 20—25 см, расправлялась на стекле и подсушивалась в токе воздуха при температуре 25° в течение 12 час. Слегка просушенная таким образом лигула затем помещалась в дистиллированную воду. Через 60 мин. происходило ее набухание и покровный слой, подобно чехлу, легко отделялся от тела паразита. После чего готовились пробы (гомогенат из покровного слоя и тела лигулы). Покровный слой и тело лигулы измельчались ножницами в фарфоровой ступке. Навеска в 1 г сырой ткани гомогенизировалась в 10 мл дистиллированной воды в стеклянном гомогенезаторе в течение 10 мин. при комнатной температуре. Активность амилазы выражалась количеством мг крахмала, расщепленного за минуту 1 мл исследуемого раствора на 1 г гомогената плероцеркоида.

Активность фермента определяли микро-экспресс методом (Асатиани, 1969). Амилолитическую активность рассчитывали по формуле: $A_{\text{ам.}} = \frac{ab}{15}$, где A — активность амилазы в единицах, a — количество крахмала, расщепившегося в пробе за 15 мин. ферментативного гидролиза, b — разведение исследуемого раствора.

Количественное определение амилолитической активности и глюкозы проводили на фотоколориметре (ФЭК-56). Всего было проведено 120 определений. Результаты подвергнуты статистической обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уже в предварительных опытах по ходу исследований нами обнаружены факты, свидетельствующие о том, что в присутствии живых плероцеркоидов лигул происходит гидролиз крахмала.

Таблица 1

Изменение времени гидролиза крахмала в присутствии плероцеркоидов *Ligula* в зависимости от его концентрации

Число опытов	Концентрация крахмала	Время расщепления крахмала (в мин. на 1 г живого веса гельминта)
3	0.001	260+12.3
4	0.01	365+5.0
4	0.1	520+8.5

что обесцвечивание раствора происходило в первую очередь непосредственно вокруг живой лигулы, затем оно постепенно распространялось на весь сосуд.

Из табл. 1 видно, что скорость расщепления крахмала в растворах, содержащих живых гельминтов, значительно увеличивается с понижением концентрации.

Гидролиз крахмала считали оконченным, когда раствор с находящимися плероцеркоидами обесцвечивался и иод (реактив Люголя) переставал давать изменение окраски испытуемой среды при добавлении его в течение первых 10 сек. Важно отметить,

Как показали наши опыты, в растворе крахмала, содержащем живых гельминтов, в течение 20 час. обнаружено присутствие глюкозы (в среднем 1.7 ± 0.15 мг% на 1 г живого веса паразита, см. рисунок).

Полученный факт позволил предположить, что плероцеркоиды лигул могут выделять амилазу, способную произвести гидролиз крахмала до глюкозы, ибо при отсутствии гельминтов в контрольных пробах не наблюдалось появление красно-вишневой окраски.

В дальнейших опытах у всех исследованных плероцеркоидов удалось обнаружить выделение амилазы в окружающую их среду. Ферментативная активность разных по весу лигул оказалась весьма различной. Молодые гельминты (вес от 0.5 до 10 г) выделяют в несколько раз больше амилазы, чем взрослые особи (вес от 10 до 20 г). Такое различие находится в полном соответствии с количеством амилазы в гомогенатах молодых и взрослых по весу лигул. В табл. 2 показаны результаты количественного определения активности амилазы плероцеркоидов, выделявшихся в дистиллированной воде в течение 12 час. при комнатной температуре.

Разница между количеством выделяемой амилазы у молодых и взрослых по весу живых гельминтов и в их гомогенатах статистически достоверна и соответственно равна ($t=6$, $t=8$).

Применив вышеописанный способ разделения покровного слоя кутикулы от тела плероцеркоида, нам удалось показать разницу в их амилолитической активности.

Таблица 2

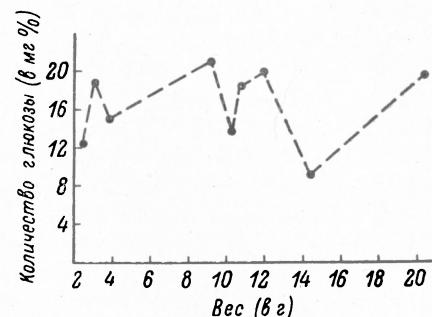
Изменение активности амилазы плероцеркоидов *Ligula* в зависимости от их веса

Вес	Возраст	Число опытов	Амилолитическая активность (в ед./мл) исследуемого раствора
1 г живого гельминта	Молодые	15	0.0087 ± 0.0001
	Взрослые	15	0.0023 ± 0.0001
1 г гомогената гельминта	Молодые	10	0.1056 ± 0.0005
	Взрослые	10	0.0218 ± 0.001

литической активности. Так, амилолитическая активность покровных слоев гельминта в среднем составляла 0.1019 ± 0.011 ед. из 10 опытов, тогда как амилолитическая активность тела — 0.0069 ± 0.001 . Превалирующие числовые значения свидетельствуют о значительном содержании амилазы в покровном слое лигул; математическая обработка материала показала их достоверность ($t=9$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов в определенной мере находят подтверждения в исследованиях по культивированию и содержанию ленточных червей в солевых растворах с добавлением питательных веществ (сыворотка крови, мясо-пептонный и рыбный бульон с глюкозой) (Марков, 1940, 1958; Давыдов, 1970; Smyth, 1946, 1947). В опытах авторы установили, что добавление этих веществ в солевую среду, содержащую паразитических червей, обусловливает максимальную продолжительность жизни их в искусственных условиях.



Содержание глюкозы (в мг%) в 1 мл 0.1% раствора крахмала в присутствии плероцеркоидов *Ligula*, разных по весу.

Обнаружение амилазы в растворах, содержащих живых плероцеркоидов лигул, способной расщеплять крахмал до глюкозы, а также значительное количество ее в поверхностном слое кутикулы паразита и литературные данные о наличии микроворсинок свидетельствуют о существовании у них пристеночного пищеварения. Необходимо отметить, что на содержание некоторых ферментов (протеаз, амилаз) в теле цестод указывали Абергальден и Вайнланд (из Зенкевича).

В результате расщепления крахмала в присутствии живых плероцеркоидов лигул образующаяся глюкоза, по-видимому, может диффундировать в тело червя как хорошо растворимое питательное вещество, так как широко известно, что они употребляют в основном только моносахара — глюкозу, галактозу (Марков, 1958; Кротов, 1969).

Анализ полученных данных позволяет заключить, что у лигул может существовать дополнительный источник питания, получаемого за счет собственных ферментов, способных участвовать в расщеплении питательных веществ хозяина. Наши выводы согласуются с предположением Уголева (1960), что у тех представителей простейших, которые стали приспособливаться к паразитическому образу жизни, гидролитические ферменты, выделяясь, находили подходящие субстраты. Продукты, возникающие при действии этих ферментов вне клетки, становились дополнительным источником питания.

Мы считаем, что присутствие механизмов, обеспечивающих расщепление и усвоение пищи за счет ферментов хозяина и собственных ферментов, обусловливает высокую приспособленность гельминтов к окружающим условиям существования. Возможно, что за счет дополнительного источника питания во много раз удлиняется, интенсифицируется жизнь паразита. Это означает прежде всего, что вред, который паразиты могут приносить в процессе своего питания, должен зависеть от физиологического состояния хозяина. Пристеночное пищеварение у плероцеркоидов лигул, вероятно, одна из многообразных форм приспособления к питанию, которая выработалась в процессе эволюции паразитизма.

Л и т е р а т у р а

- А с а т и а н и В. С. 1969. Ферментативные методы анализа. Изд. «Наука», М. : 455—456.
- Д а в ы д о в О. Н. 1970. К методике содержания паразитических червей рыб. Гидробиол. журн., 6 (3) : 122—124.
- Д у б и н и н а М. Н. 1966. Ремнексы фауны СССР. Изд. «Наука», М.—Л. : 5—259.
- З е н к е в и ч Л. А. 1937. Руководство по зоологии. Биомедгиз, 1 : 546—547.
- К р о т о в А. И. 1961. Экспериментальная терапия гельминтозов. Медгиз : 5—191.
- К р о т о в А. И. 1969. Физиология гельминтов (питание, осморегуляция и выделение). Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 48 (2) : 226—233.
- Л о г а ч е в Е. Д. 1955. О тонком строении покровной кутикулы trematod и цестод. ДАН СССР, 103 (5) : 941—943.
- М а р к о в Г. С. 1940. Обмен веществ у паразитических червей. Природа, 29 (12) : 82—88.
- М а р к о в Г. С. 1946. Способы питания паразитических червей. Природа, 35 (12) : 28—36.
- М а р к о в Г. С. 1958. Физиология паразитов рыб. В кн.: Основные проблемы паразитологии рыб. Изд. ЛГУ : 122—143.
- Т и м о ф е е в В. А. 1964. Строение кутикулы *Schistocephalus pungitii* на разных фазах его развития в связи с особенностями питания цестод. В кн.: Электронная и флюоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 50—60.
- У г о л е в А. М. 1960. О существовании пристеночного (контактного) пищеварения. Бюлл. эксперимент. биол. и мед., 49 (1) : 12—15.
- У г о л е в А. М. 1961. Пищеварение и его приспособительная эволюция. Изд. «Высшая школа», М. : 9—302.
- С h a r g l e s J. H., O r g g T. S. L. 1968. Comparative fine structure of outer tegument of *Ligula intestinalis* and *Schistocephalus solidus*. Exp. Parasitol., 22 : 137—149.
- L u m s d e n R. D. 1966. Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. I. The fine structure of the strobilar integument. Zeit. für Parasitenkunde, 27 : 355—382.
- R o t h m a n A. H. 1968. Enzyme localization and colloid transport in *Haematoloechus medioplexus*. J. Parasitol., 54 : 286—294.
- R o t h m a n A. H. 1960. Ultrasmicroscopic evidence of absorptive function on cestodes. J. Parasitol., 46 : 10—15.

- Smyth J. D. 1946. Studies on tapeworm physiology. I. The cultivation of *Schistocephalus solidus* in vitro. *J. Exp. Biol.*, London, 21 (1) : 47—70.
Smyth J. D. 1947. Studies on tapeworm physiology. II. Cultivation and development of *Ligula intestinalis* in vitro. *Parasitology*, 38 (3) : 173—181.
Threadgold L. T. 1965. An electron microscope study of the tegument and associated structures of *Proteocephalus poelanicollis*. *J. Parasitol.*, 55 : 467—472.
-

MEMBRANE DIGESTION
OF PLEROCERCIDS OF *LIGULA INTESTINALIS*

O. N. Davydov and L. Ja. Kosenko

SUMMARY

The finding of amylase in solutions containing alive plerocercoids of *Ligula intestinalis* capable of splitting starch to glucose, a considerable quantity of amylase in the surface layer of the parasite's cuticle and literary data on the presence of microvilli suggest the existence of membrane (contact) digestion in these helminths.

The analysis of results obtained indicates that plerocercoids of *L. intestinalis* have apparently an additional source of feeding on account of the activity of their own ferments which split intensively the food of the host.

Membrane digestion of *L. intestinalis* is likely to be one of numerous forms of adaptation to feeding which arose within the evolution of parasitism.
